

# BEST AVAILABLE COPY



**PCT**

WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION  
International Bureau

INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

<p>(51) International Patent Classification <sup>6</sup> : <b>C12N 5/00, 5/02, 5/06, 5/08, 5/10, 15/00, 1/38</b></p>	<p><b>A1</b></p>	<p>(11) International Publication Number: <b>WO 98/30679</b></p> <p>(43) International Publication Date: 16 July 1998 (16.07.98)</p>
<p>(21) International Application Number: <b>PCT/US98/00467</b></p> <p>(22) International Filing Date: 9 January 1998 (09.01.98)</p> <p>(30) Priority Data: 08/781,772 10 January 1997 (10.01.97) <b>US</b></p> <p>(71) Applicant: <b>LIFE TECHNOLOGIES, INC. [US/US]; 9800 Medical Center Drive, Rockville, MD 20850 (US).</b></p> <p>(72) Inventors: <b>PRICE, Paul, J.; 230 Deerwood Lane, Grand Island, NY 14072 (US). GOLDSBOROUGH, Mindy, D.; 8304 Giantstep Place, Gaithersburg, MD 20879 (US). TILKINS, Mary, Lynn; 6716 Lindbergh Avenue, Niagara Falls, NY 14304 (US).</b></p> <p>(74) Agents: <b>ESMOND, Robert, W. et al.; Sterne, Kessler, Goldstein &amp; Fox P.L.L.C., Suite 600, 1100 New York Avenue, N.W., Washington, DC 20005-3934 (US).</b></p>	<p>(81) Designated States: <b>AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, GW, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</b></p> <p><b>Published</b> <i>With international search report.</i></p>	
<p>(54) Title: <b>EMBRYONIC STEM CELL SERUM REPLACEMENT</b></p>		
<p>(57) Abstract</p> <p>The present invention provides a serum-free supplement which supports the growth of embryonic stem cells in culture. Also provided are a medium comprising a basal medium supplemented with the serum-free supplement of the present invention. The present invention also provides methods for culturing and isolating embryonic stem cells, methods for producing a transgenic animal, and methods for expressing recombinant protein in embryonic stem cells and transgenic animals.</p>		

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2001-508302

(P2001-508302A)

(43) 公表日 平成13年6月26日 (2001.6.26)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テマコード (参考)
C 1 2 N 5/10		C 1 2 N 5/00	B
A 0 1 K 67/027		A 0 1 K 67/027	
C 1 2 N 5/02		C 1 2 N 5/02	
15/09		15/00	A
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 66 頁)			

(21) 出願番号 特願平10-531158  
 (86) (22) 出願日 平成10年1月9日 (1998.1.9)  
 (85) 翻訳文提出日 平成11年7月9日 (1999.7.9)  
 (86) 国際出願番号 P C T / U S 9 8 / 0 0 4 6 7  
 (87) 国際公開番号 W O 9 8 / 3 0 6 7 9  
 (87) 国際公開日 平成10年7月16日 (1998.7.16)  
 (31) 優先権主張番号 0 8 / 7 8 1 , 7 7 2  
 (32) 優先日 平成9年10月1日 (1997.10.1)  
 (33) 優先権主張国 米国 (U S)

(71) 出願人 ライフ テクノロジーズ, インコーポレイ  
 テッド  
 アメリカ合衆国 メリーランド 20850,  
 ロックビル, メディカル センター ドラ  
 イブ 9800  
 (72) 発明者 ブライス, ボール ジェイ.  
 アメリカ合衆国 ニューヨーク 14072,  
 グランド アイランド, ディアウッド レ  
 ーン 230  
 (74) 代理人 弁理士 山本 秀策

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 胚性幹細胞血清置換

(57) 【要約】

本発明は、培養において胚性幹細胞の増殖を支持する、無血清補充物を提供する。本発明の無血清補充物を補充した基本培地を含む培地もまた提供される。本発明はまた、胚性幹細胞を培養および単離するための方法、トランスジェニック動物を産生するための方法、ならびに胚性幹細胞およびトランスジェニック動物において、組換えタンパク質を発現するための方法も提供する。

らなる群から選択される、請求項 1 に記載の無血清真核生物細胞培養培地補充物。

8. 前記インスリン置換物が、硫化亜鉛七水和物である、請求項 7 に記載の無血清真核生物細胞培養培地補充物。

9. 前記アミノ酸成分が、グリシン、L-アラニン、L-アスパラギン、L-システイン、L-アスパラギン酸、L-グルタミン酸、L-フェニルアラニン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-リジン、L-ロイシン、L-グルタミン、L-アルギニン、L-メチオニン、L-プロリン、L-ヒドロキシプロリン、L-セリン、L-スレオニン、L-トリプトファン、L-チロシン、およびL-バリン、ならびにそれらの誘導体からなる群から選択される 1 つ以上のアミノ酸を含む、請求項 1 に記載の無血清真核生物細胞培養培地補充物。

10. 前記アルブミン置換物が、ウシ下垂体抽出物、植物加水分解物、ウシ胎仔アルブミン（フェチュイン）、卵アルブミン、ヒト血清アルブミン（HSA）、ニワトリ抽出物、ウシ胎仔抽出物、AlbuMAX® I、およびAlbuMAX® II からなる群から

選択される、請求項 1 に記載の無血清真核生物細胞培養培地補充物。

11. 前記アルブミン置換物が、AlbuMAX® I である、請求項 1 に記載の無血清真核生物細胞培養培地補充物。

12. 前記微量元素成分が、 $\text{Ag}^+$ 、 $\text{Al}^{3+}$ 、 $\text{Ba}^{2+}$ 、 $\text{Cd}^{2+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$ 、 $\text{Cr}^{3+}$ 、 $\text{Ge}^{4+}$ 、 $\text{Se}^{4+}$ 、 $\text{Br}^-$ 、 $\text{I}^-$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{F}^-$ 、 $\text{Si}^{4+}$ 、 $\text{V}^{5+}$ 、 $\text{Mo}^{6+}$ 、 $\text{Ni}^{2+}$ 、 $\text{Rb}^+$ 、 $\text{Sn}^{2+}$ 、および $\text{Zr}^{4+}$ からなる群から選択さ

れる 1 つ以上の微量元素部分を含む、請求項 1 に記載の無血清真核生物細胞培養培地補充物。

13. 前記補充物が濃縮される、請求項 1 に記載の無血清真核生物細胞培養培地補充物。

14. 前記補充物が、約 2 倍～約 10 倍濃縮される、請求項 1 に記載の無血清真核生物細胞培養培地補充物。

15. 前記補充物が、約 0.5%～約 90% の最終濃度まで基本培地に添加される、請求項 1 に記載の無血清真核生物細胞培養培地補充物。

グルタチオン、L-アスコルビン酸-2-ホスフェート、鉄飽和トランスフェリン、インスリン、亜セレン酸ナトリウム、 $\text{Ag}^+$ 塩、 $\text{Al}^{3+}$ 塩、 $\text{Ba}^{2+}$ 塩、 $\text{Cd}^{2+}$ 塩、 $\text{Co}^{2+}$ 塩、 $\text{Cr}^{3+}$ 塩、 $\text{Ge}^{4+}$ 塩、 $\text{Se}^{4+}$ 塩、 $\text{Br}^-$ 塩、 $\text{I}^-$ 塩、 $\text{Mn}^{2+}$ 塩、 $\text{F}^-$ 塩、 $\text{Si}^{4+}$ 塩、 $\text{V}^{5+}$ 塩、 $\text{Mo}^{6+}$ 塩、 $\text{Ni}^{2+}$ 塩、 $\text{Rb}^+$ 塩、 $\text{Sn}^{2+}$ 塩、および $\text{Zr}^{4+}$ 塩を組み合わせることによって得られる無血清真核生物細胞培養培地補充物であって、

ここで各成分が、基本培地に添加された場合に、無血清培養において胚性幹細胞の増殖を支持する量で存在する、無血清真核生物細胞培養培地補充物。

23. 前記 $\text{Ag}^+$ 塩が $\text{AgNO}_3$ であり、前記 $\text{Al}^{3+}$ 塩が $\text{AlCl}_3$ 六水和物であり、前記 $\text{Ba}^{2+}$ 塩が $\text{Ba}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ であり、前記 $\text{Cd}^{2+}$ 塩が $\text{CdSO}_4$ 八水和物であり、前記 $\text{Co}^{2+}$ 塩が $\text{CoCl}_2$ 六水和物であり、前記 $\text{Cr}^{3+}$ 塩が $\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_3$ 一水和物であり、前記 $\text{Ge}^{4+}$ 塩が $\text{GeO}_2$ であり、前記 $\text{Se}^{4+}$ 塩が $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ および $\text{H}_2\text{SeO}_3$ であり、前記 $\text{Br}^-$ 塩が $\text{KBr}$ であり、前記 $\text{I}^-$ 塩が $\text{KI}$ であり、

前記 $\text{Mn}^{2+}$ 塩が $\text{MnCl}_2$ 四水和物であり、前記 $\text{F}^-$ 塩が $\text{NaF}$ であり、前記 $\text{Si}^{4+}$ 塩が $\text{Na}_2\text{SiO}_3$ 九水和物、前記 $\text{V}^{5+}$ 塩が $\text{NaVO}_3$ であり、前記 $\text{Mo}^{6+}$ 塩が $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ 四水和物であり、前記 $\text{Ni}^{2+}$ 塩が $\text{NiSO}_4$ 六水和物であり、前記 $\text{Rb}^+$ 塩が $\text{RbCl}$ であり、前記 $\text{Sn}^{2+}$ 塩が $\text{SnCl}_2$ であり、そして前記 $\text{Zr}^{4+}$ 塩が $\text{ZrOCl}_2$ 八水和物である、請求項22に記載の無血清真核生物細胞培養培地補充物。

24. 無血清真核生物細胞培養培地補充物を作製する方法であって、該方法は、水、AlubMAX®I、グリシン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-メチオニン、L-

フェニルアラニン、L-プロリン、L-ヒドロキシプロリン、L-セリン、L-スレオニン、L-トリプトファン、L-チロシン、L-バリン、チアミン、還元グルタチオン、L-アスコルビン酸-2-ホスフェート、鉄飽和トランスフェリン、インスリン、亜セレン酸ナトリウム、 $\text{Ag}^+$ 塩、 $\text{Al}^{3+}$ 塩、 $\text{Ba}^{2+}$ 塩、 $\text{Cd}^{2+}$ 塩、 $\text{Co}^{2+}$ 塩、 $\text{Cr}^{3+}$ 塩、 $\text{Ge}^{4+}$ 塩、 $\text{Se}^{4+}$ 塩、 $\text{Br}^-$ 塩、 $\text{I}^-$ 塩、 $\text{Mn}^{2+}$ 塩、 $\text{F}^-$ 塩、 $\text{Si}^{4+}$ 塩、 $\text{V}^{5+}$ 塩、 $\text{Mo}^{6+}$ 塩、 $\text{Ni}^{2+}$ 塩、 $\text{Rb}^+$ 塩、 $\text{Sn}^{2+}$ 塩、および $\text{Zr}^{4+}$ 塩を混合する工程を包含し、

ここで各成分が、基本培地に添加された場合に、無血清培養において胚性幹細胞の増殖を支持する量で存在する、方法

25. 前記 $\text{Ag}^+$ 塩が $\text{AgNO}_3$ であり、前記 $\text{Al}^{3+}$ 塩が $\text{AlCl}_3$ 六水和物であり、前記 $\text{Ba}^{2+}$

ここで該培地が、無血清培養において胚性幹細胞の増殖を支持し得る、無血清真核生物細胞培養培地。

35. 無血清真核生物細胞培養培地を作製する方法であって、該方法は、基本細胞培養培地と、請求項1に記載の補充物とを混合する工程を包含し、

ここで該培地が、無血清培養において胚性幹細胞の増殖を支持し得る、方法。

36. 前記培地が1×処方物である、請求項35に記載の方法。

37. 前記培地が濃縮された処方物である、請求項35に記載の方法。

38. 前記補充物の最終濃度が、約0.5%～約90%である、請求項35に記載の方法による無血清真核生物細胞培養培地。

39. 前記補充物の最終濃度が、約5%～約50%である、請求項38に記載の方法による無血清真核生物細胞培養培地。

40. 前記補充物の最終濃度が、約5%～約30%である、請求項39に記載の方法による無血清真核生物細胞培養培地。

41. 前記補充物の最終濃度が、約5%～約20%である、請求項40に記載の方法による無血清真核生物細胞培養培地。

42. 前記補充物の最終濃度が、約15%である、請求項41に記載の方法による無血清真核生物細胞培養培地。

43. 無血清培地において胚性幹細胞を含む組成物であって、該無血清培地が、無血清培地において胚性幹細胞の増殖を支持し得る、組成物。

44. 前記培地が、請求項26または34に記載の培地である、請求項43に記載の組成物。

45. 前記組成物が、約-135℃以下で無期限に保存され得る、請求項44に記載の組成物。

46. 前記胚性幹細胞が、ヒト、有尾猿、無尾猿、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、モルモット、ウシ、ブタ、イヌ、ウマ、ネコ、ヤギ、ヒツジ、鳥類、爬虫類、魚、および両生類からなる群から選択される動物から得られる、請求項45に記載の組成物。

(d) 該組換え胚性幹細胞クローンを拡大して、集団を形成する工程；

(e) 該組換え胚性幹細胞クローン集団のアリコート、胚盤胞に注入する工程；

(f) 該注入した胚盤胞を、宿主偽妊娠雌性動物に移す工程；および

(g) トランスジェニック子孫を選択する工程、

を包含する、方法。

57. 前記培養工程が、

(a1) 前記胚性幹細胞を、請求項26または34に記載の培地と接触させる工程；および

(a2) 該胚性幹細胞を、該胚性幹細胞の拡大を容易にするのに適した無血清条件下で、無血清培地において培養する工程、

をさらに包含する、請求項56に記載の方法。

58. 前記胚性幹細胞を、支持細胞の層上に播種する工程を包含する、請求項57に記載の方法。

59. トランスジェニック動物を産生する方法であって、

(a) 胚性幹細胞を、請求項26または34に記載の培地において培養する工程；

(b) 核酸分子を、該胚性幹細胞に導入する工程；

(c) 組換え胚性幹細胞クローンを選択する工程；

(d) 該組換え胚性細胞クローンを拡大して、集団を形成する工程；

(e) 少数の該胚性幹細胞を、初期胚と同時培養して、胚の凝集を形成する工程；

(f) 該凝集した胚を、宿主偽妊娠雌性動物に移入する工程；および

(g) トランスジェニック子孫を選択する工程、

を包含する、方法。

60. 前記培養工程が、

(a1) 前記胚性幹細胞を、請求項26または34に記載の培地と接触させる工程；および

65. 組換えタンパク質を、トランスジェニック動物から産生する方法であって

(a) 胚性幹細胞を、請求項26または34に記載の培地において培養する工程；

(b) 該タンパク質をコードする目的のタンパク質をコードする核酸分子を含む核酸構築物を、該胚性幹細胞に導入する工程；

(c) 組換え胚性幹細胞クローンを選択する工程；

(d) 該組換え胚性幹細胞クローンを拡大して、組換え胚性幹細胞の集団を形成する工程；

(e) 少数の胚性幹細胞を、初期胚と同時培養して、胚の凝集を形成する工程；

(f) 該注入された胚盤胞を、宿主偽妊娠雌性動物に移入する工程；

(g) トランスジェニック子孫を選択する工程；

(h) 該選択されたトランスジェニック動物を、該トランスジェニック動物の健康を促進するのに適した条件下で育成させる工程；および

(i) 該組換えタンパク質を、該トランスジェニック動物から単離する工程、を包含する、方法。

66. 前記方法が、

(a1) 前記胚性幹細胞を、請求項26または34に記載の培地と接触させる工程；および

(a2) 前記胚性幹細胞を、無血清培養において前記胚性幹細胞の拡大を促進するのに適した条件下で培養する工程、をさらに包含する、請求項67に記載の方法。

67. 前記胚性幹細胞を、支持細胞の層上に播種する工程をさらに包含する、請求項66に記載の方法。

68. 無血清培養において、胚性幹細胞の分化を制御または予防するための方法であって、

(a) 該胚性幹細胞を、請求項26または34に記載の培地と接触させる工程

件下で、前記胚性幹細胞を培養する工程が、前記胚性幹細胞の分化を予防する 1 つ以上の増殖因子を前記培養培地に補充することをさらに包含する、請求項 7 6 に記載の方法。

7 9. 前記拡大された胚性幹細胞を培養する工程が、前記胚性幹細胞の分化を促進する 1 つ以上の増殖因子を前記培養培地に補充する工程をさらに包含する、請求項 7 6 に記載の方法。

8 0. 無血清培養において、分化した胚性幹細胞を哺乳動物に提供する方法であって、

(a) 胚性幹細胞を、請求項 2 6 または 3 4 に記載の培地に接触させる工程；

(b) 胚性幹細胞を、無血清培養において該胚性幹細胞の拡大を促進するのに適した条件下で培養する工程；

(c) 分化因子を添加するか、または培養条件を変更して、胚性幹細胞の分化を誘導して、異なる型の細胞を形成する工程；および

(d) 該分化した細胞を、哺乳動物に導入する工程、

を包含する、方法。

8 1. 前記胚性幹細胞を、支持細胞の層上に播種する工程をさらに包含する、請求項 8 0 に記載の方法。

8 2. 前記胚性幹細胞を、該細胞の分化を予防するのに適した無血清条件下で培養する工程が、1 つ以上の因子を前記培養培地に補充することをさらに包含する、請求項 8 0 に記載の方法。

8 3. 前記因子が白血病抑制因子である、請求項 8 2 に記載の方法。

8 4. 前記細胞の分化を誘導するのに適した条件下で、前記拡大した胚性幹細胞を培養する工程が、1 つ以上の増殖因子を前記培養培地に補充することをさらに包含する、請求項 8 0 に記載の方法。

8 5. 無血清培養において胚性幹細胞を得る方法であって、

(a) 胚性幹細胞を、胚盤胞から単離する工程；および

(b) 該単離された胚性幹細胞を、請求項 2 6 または 3 4 に記載の培地において培養する工程、



## 【発明の詳細な説明】

## 胚性幹細胞血清置換

## 発明の分野

本発明は、胚性幹(ES)細胞およびハイブリドーマのような他の細胞型の単離および増殖に通常必要とされる血清補充の置換に関する。

## 発明の背景

ES細胞は、胚盤胞の内部細胞塊に由来する株化細胞系である。未分化細胞は、多能性であり、そして生殖系列をふくむ全組織の形成に関与する。胚盤胞または桑実胚への注入後、あるいは桑実胚による凝集後(Wood, S. A. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:4582-4585(1993))、ES細胞は、二つの異なるゲノムを有する子孫(すなわち、キメラ子孫)を生成する。ESが住む生殖細胞を有するキメラ動物を繁殖させることにより、ES細胞ゲノムと同型接合性である系の株化を生じ得る。

相同遺伝子組換え技術およびES細胞を使用し、研究者は、標的化様式において、部位特異的変異をゲノムに導入し得る。この技術は、得られたトランスジェニック動物での遺伝子機能および調節の研究を促進する(Capecchi, M. R.、Science 244:1288-1292(1989))。遺伝子ターゲティング実験に加えて、ES細胞は、ヒト疾病の動物モデルの作製(Smithies, O. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA:5266-5272(1995))および細胞分化過程の研究モデル(Doetschman, T. C. ら、J. Embryol. Exp. Morph. 87:27-45(1985))のようなものを含む医学的研究のための多くのアプリケーションを有する。

ES細胞は、通常、一次胚組織胚盤胞またはSTO細胞のいずれかの不活化支持細胞の予めプレートした層で継代培養される。支持細胞は、ES細胞付着のためのマトリックスを提供する。さらに、不明確な成長因子に寄与することにより、支持細胞は、培養物中のES細胞分化を防止する上で重要な役割を果たす。

ES細胞を遺伝子ターゲティングまたは細胞前駆体のような用途に使用する場合、ES細胞の胚性多分化性(すなわち、非分化性)表現型を必ず保護しなければなら

予備スクリーニングを行った血清のロットを $-20^{\circ}\text{C}$ 以下で貯蔵するのは、問題がある。

従って、ES細胞の単離、培養物中のES細胞の培養、ES細胞の増殖、ES細胞の分化の制御およびES細胞の外移植のような、ES細胞に関する研究は、血清の必要性によって妨げられる。従って、無血清培地補充物および無血清培地について、培養物中でのES細胞分化を促進または誘導することなく、ES細胞の増殖および伸張を支持する必要性が残存する。

#### 発明の要旨

本発明は、無血清真核生物細胞培養培地補充物を提供する。ここで、無血清補充物を補充した基本細胞培養培地は、無血清培養物中のES細胞の増殖を支持し得る。

無血清真核生物細胞培養培地補充物は、アルブミンまたはアルブミン置換物、一種以上のアミノ酸、一種以上のビタミン、一種以上のトランスフェリンまたはトランスフェリン置換物、一種以上の抗酸化剤、一種以上のインスリンまたはインスリン置換物、一種以上のコラーゲン前駆体および一種以上の微量元素から成る群から選択した一種以上の成分を含有するか、または一種以上の成分を組み合わせることにより得られる。好ましくは、本発明の補充物は、アルブミンまたはアルブミン置換物ならびに、一種以上のアミノ酸、一種以上のビタミン、一種以上のトランスフェリンまたはトランスフェリン置換物、一種以上の抗酸化剤、一種以上のインスリンまたはインスリン置換物、一種以上のコラーゲン前駆体および一種以上の微量元素から成る群から選択した一種以上の成分を有する。

本発明は、特に、無血清真核生物細胞培養培地補充物を提供し、この補充物は、Albumax®I、ならびにグリシン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-メチオニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-ヒドロキシプロリン、L-セリン、L-スレオニン、L-トリプトファン、L-チロシン、L-バリン、チアミン、還元型グルタチオン、L-アスコルビン酸-2-リン酸塩、鉄飽和トランスフェリン、インスリンおよび微量元素成分 $\text{Ag}^+$ 、 $\text{Al}^{3+}$ 、 $\text{Ba}^{2+}$ 、 $\text{Cd}^{2+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$ 、 $\text{Cr}^{3+}$ 、 $\text{Ge}^{4+}$ 、 $\text{Se}^{4+}$ 、 $\text{Br}^-$ 、 $\text{I}^-$ 、 $\text{Mn}$

子孫を選択する工程を包含する。本発明はまた、この方法によって得られるトランスジェニック動物も提供する。

本発明は、トランスジェニック動物生成方法も提供する。この方法は、ES細胞

を無血清培養物中で培養する工程、核酸分子をES細胞に導入する工程、組換えES細胞クローンを選択する工程、組換えES細胞クローンを拡大して集団を形成させる工程、少数のES細胞を初期胚（例えば、8細胞桑実胚）と同時培養して胚凝集物を形成する工程、凝集した胚を宿主偽妊娠雌性動物に移入する工程、およびトランスジェニック子孫を選択する工程を包含する。本発明は、この方法によって得られるトランスジェニック動物も提供する。

また、本発明は、トランスジェニック動物から組換えタンパク質を生成する方法を提供し、この方法は、ES細胞を無血清培養物中で培養する工程、目的のタンパク質をコードする核酸分子を含む核酸構築物をES細胞に導入する工程、組換えES細胞クローンを選択する工程、組換えES細胞クローンを拡大して集団を形成させる工程、組換えES細胞クローン集団を胚盤胞に注入する工程、注入した胚盤胞を宿主偽妊娠雌性動物に移入する工程、トランスジェニック子孫を選択する工程、動物の健康促進に適した条件下で、選択したトランスジェニック動物を育成する工程、およびトランスジェニック動物から組換えタンパク質を単離する工程を包含する。本発明はまた、この方法によって得られたタンパク質も提供する。

また、本発明は、トランスジェニック動物から組換えタンパク質を生成する方法を提供する工程、この方法は、ES細胞を無血清培養物中で培養する工程、目的のタンパク質をコードする核酸分子を含む核酸構築物をES細胞に導入する工程、組換えES細胞クローンを選択する工程、組換えES細胞クローンを拡大して集団を形成させる工程、少数のES細胞を初期胚（例えば、8細胞桑実胚）と同時培養して胚凝集物を形成する工程、凝集胚を宿主偽妊娠雌性動物に移入する工程、トランスジェニック子孫を選択する工程、動物の健康促進に適した条件下で、選択したトランスジェニック動物を育成する工程、およびトランスジェニック動物から組換えタンパク質を単離する工程を包含する。本発明はまた、この方法によって得られる組換えタンパク質も提供する。

7日間増殖後のES細胞コロニーを示す。

図1Bは、アルカリホスファターゼ活性を検出するため固定および染色した後のESコロニーを示す。培養条件は、図1Aと同じであった。

図2Aは、L-グルタミン、NEAA、2-メルカプトエタノール、ペニシリン/ストレプトマイシン、LIF (10ng/mL) および15%濃度の本発明の無血清補充物を補充したDMEM中で7日間増殖後のES細胞コロニーを示す。

図2Bは、アルカリホスファターゼ活性を検出するため固定および染色した後のES細胞コロニーを示す。培養条件は、図2Aと同じであった。

#### 発明の詳細な説明

次の説明において、細胞培養培地分野においておよび真核生物細胞の増殖について慣例的に使用される多数の用語が広範に使用される。明細書および請求の範囲、ならびにこのような用語に与えられる範囲の明確かつ一貫した理解を提供するため、次の定義を提供する。

「アルブミン置換物」という用語は、本発明の補充物においてアルブミン（例えば、ウシ血清アルブミン(BSA)またはAlbuMAX®I）の代わりに使用され、アルブ

ミンと実質的に類似した結果を与え得る化合物をいう。アルブミン置換物は、任意のタンパク質またはポリペプチド源であり得る。このようなタンパク質またはポリペプチドサンプルの例として、ウシ下垂体抽出物、植物加水分解産物（例えば、コメ加水分解産物）、ウシ胎仔アルブミン（フェチュイン）、卵アルブミン、ヒト血清アルブミン(HSA)、または別の動物由来アルブミン、雛抽出物、ウシ胚

抽出物、AlbuMAX®IおよびAlbuMAX®IIが挙げられるが、これらに限定されない。

好ましくは、アルブミン置換物は、AlbuMAX®Iである。本発明の補充物および培

地において、細胞培養を促進するアルブミンまたはアルブミン置換物の濃度は、日常的な実験方法のみを使用して測定され得る。

「トランスフェリン置換物」という用語は、本発明の補充物中でトランスフェリンを置き換え、トランスフェリンと実質的に類似した結果を与え得る任意の化合物をいう。トランスフェリン置換物の例として、任意の鉄キレート化合物が挙

元型グルタチオンおよびアスコルビン酸-2-リン酸塩またはその誘導体が挙げられるが、これらに限定されない。

「成分」という用語は、細胞培養培地中で使用され、細胞の成長または増殖を維持または促進し得る化学的および生物学的起源の任意の化合物をいう。「成分 (component)」、「栄養素」および「成分 (ingredient)」という用語は、互換的に使用され得、これらはすべて、このような化合物をいう。細胞培養培地で使用される代表的な成分には、アミノ酸、塩、金属、糖、脂質、核酸、ホルモン、

ビタミン、脂肪酸、タンパク質などが挙げられる。エクスビポで細胞の増殖を促進または維持する他の成分は、特定の必要性に従って、当業者により選択される。

「細胞培養物」とは、人工的なインビトロ環境で維持、培養または増殖される細胞または組織を意味する。

「培養容器」とは、細胞を増殖させるための無菌環境を提供し得る様々なサイズのガラス容器、プラスチック容器または他の容器を意味する。例えば、フラスコ、単一または複合ウエルプレート、単一または複合ウエル皿、もしくは複合ウエルマイクロプレートが使用され得る。

「細胞培養培地」、「培養培地」および「培地処方物」という用語は、細胞を培養または増殖させるための栄養性溶液をいう。

「培養 (cultivation)」および「培養 (culturing)」という用語は、同義語である。

「容器手段」という用語には、培養容器、ジャー、瓶、バイアル、ストロー、アンプルおよび凍結チューブなどが挙げられる。

「栄養補給」または「流体交換」という用語は、細胞を培養する培地の取り替えをいう。

「混合」という用語は、細胞培養培地処方物中の成分の混合 (mixing) または混合 (admixing) をいう。

「接触」という用語は、一種以上の細胞と、一種以上の化合物、溶液、培地などとの混合、添加、接種、または攪拌をいう。

して)、1×処方物中の各成分は、細胞培養培地中のこれらの成分とほぼ等しい濃度を有する。例えば、RPMI 1640培養培地は、特に、0.2g/L L-アルギニン、0.05g/L L-アスパラギンおよび0.02g/L L-アスパラギン酸を含有する。本発明に従って適合性のある成分である、これらのアミノ酸の「1×処方物」は、溶液中でこれらの成分をほぼ同じ濃度含有する。従って、「1×処方物」をいう場合、溶液中の各成分は、上述の細胞培養培地中に認められる成分濃度と同じか、ほぼ同じとする。1×処方物中の培地成分濃度は、当業者にとって周知である。Method s For Preparation of Media, Supplements and Substrate For Serum-Free Animal Cell Culture, Allen R. Liss, N.Y. (1984)を参照のこと。これはその全

体を、本明細書において参照文献として援用する。

10×処方物は、溶液中の各成分が細胞培養培地の同じ成分よりも約10倍濃縮された溶液を指す。例えば、RPMI 1640培地は、特に、0.3g/L L-グルタミンを含有する。「10×処方物」は、1×培養培地で認められる濃度の約10倍濃度で、さらに多くの成分を含有し得る。明らかなように、「25×製剤」、「50×製剤」および「100×製剤」は、1×細胞培養培地と比較して、それぞれ約25、50または100倍濃度で成分を含有する溶液を示す。

「微量元素」または「微量元素部分」という用語は、細胞培養培地中に微量しか存在しない部分を指す。本発明において、これらの用語は、 $\text{Ag}^+$ 、 $\text{Al}^{3+}$ 、 $\text{Ba}^{2+}$ 、 $\text{Cd}^{2+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$ 、 $\text{Cr}^{3+}$ 、 $\text{Ge}^{4+}$ 、 $\text{Se}^{4+}$ 、 $\text{Br}^-$ 、 $\text{I}^-$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{F}^-$ 、 $\text{Si}^{4+}$ 、 $\text{V}^{5+}$ 、 $\text{Mo}^{6+}$ 、 $\text{Ni}^{2+}$ 、 $\text{Rb}^+$ 、 $\text{Sn}^{2+}$ および $\text{Zn}^{4+}$ ならびにそれらの塩を包含する。微量元素部分の適切な濃度は、当業者により決定され得る（表2を参照のこと）。

所定の微量元素部分の塩を使用して本発明の補充物または培地を作製し得る。例えば、次の塩を使用し得る。 $\text{AgNO}_3$ 、 $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{Ba}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ 、 $\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 1\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{GeO}_2$ 、 $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ 、 $\text{H}_2\text{SeO}_3$ 、 $\text{KBr}$ 、 $\text{KI}$ 、 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{NaF}$ 、 $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{NaVO}_3$ 、 $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{RbCl}$ 、 $\text{SnCl}_2$ および $\text{ZrOCl}_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ 。微量元素部分含有化合物の適切な濃度は、当業者により決定され得る（表3を参照のこと）。

セレン、ケイ素、バナジウム、モリブデンおよびジルコニウムを含有する化

ーターおよび／またはエンハンサー、遺伝子調節タンパク質が結合し、そして遺伝子転写制御を実行する調節配列)に作動可能に連結された、目的のタンパク質をコードする核酸を含む発現ベクターである。使用され得る発現ベクターは、通常の当業者にとって周知である。

「基本培地」という用語は、血清または本発明の無血清補充物のいずれかを補った場合、ES細胞または他の細胞の増殖を支持し得る任意の培地を指す。基本培地は、亜鉛、鉄、マグネシウム、カルシウムおよびカリウムなどの標準無機塩、ならびにビタミン、グルコース、緩衝系および必須アミノ酸を供給する。本発明に使用し得る基本培地には、Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)、Minimal Essential Medium (MEM)、Basal Medium Eagle (BME)、RPMI 1640、F-10、F-12、 $\alpha$  Minimal Essential Medium ( $\alpha$  MEM)、Glasgow's Minimal Essential Medium (GM

EM) および Iscove's Modified Dulbecco's Medium などが挙げられるが、これらに限定されない。好ましい実施態様において、基本培地は、ビルビン酸のナトリウム塩添加を有するか有さないかのいずれかの高グルコースを有する DMEM である。ピリドキシン HCl をピリドキサールの代わりに使用し得る。

「無血清培養条件」および「無血清条件」という用語は、どのような型の血清も除外した細胞培養条件を指す。

本発明は、ES細胞および他の細胞型を樹立および増殖させるための完全培地の血清成分置換物を提供する。無血清真核生物細胞培養培地補充物は、アルブミンまたはアルブミン置換物、一種以上のアミノ酸、一種以上のビタミン、一種以上のトランスフェリンまたはトランスフェリン置換物、一種以上の抗酸化剤、一種以上のインシュリンまたはインシュリン置換物、一種以上のコラーゲン前駆体、および一種以上の微量元素からなる群から選択される一種以上の成分を有するか、または混合して得る。好ましくは、本発明の補充物は、アルブミンまたはアルブミン置換物、ならびに、一種以上のアミノ酸、一種以上のビタミン、一種以上のトランスフェリンまたはトランスフェリン置換物、一種以上の抗酸化剤、一種以上のインシュリンまたはインシュリン置換物、一種以上のコラーゲン前駆体お

ないことから、熱非働化する必要がない。

ES細胞は、そのゲノムに部位特異的改変を含有するトランスジェニック動物の作製において主要な有用性を有する。ES細胞の遺伝子構造を変更するために、遺伝的に変更した遺伝子のコピーを含有する核酸分子または構築物をES細胞に導入する。ES細胞への核酸の導入は、リン酸カルシウムでの沈降(Gossler, A. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA: 9065-9069 (1989))、レトロウイルス感染(Robertson, E. ら、Nature 323:445-448 (1986))、エレクトロポレーション(Thompson, S. ら、Cell 56:313-321 (1989))およびカチオン性脂質(Lamb, B. T. ら、Nature Genetics 5:22-29 (1993))を含む、多くの方法で達成されてきた。

核酸分子または構築物を取り込むES細胞画分では、導入核酸分子または構築物は、その遺伝子の天然のコピーとの相同組換えを受ける。適切な選択遺伝子(または複数の遺伝子)を核酸分子または構築物に組み込んで、培養培地への選択薬物の添加により組換えES細胞の薬物選択を可能にする。核酸分子または構築物の導入および薬物でのクローン選択後、ESクローンをPCRまたはサザンブロット

法のいずれかにより分析し、正確な遺伝子ターゲティングを確認する。

次に、選択したESクローンを胚盤胞に注射する。これは、組換えES細胞を15回程注射して、胚盤胞の近隣内部細胞塊と混合し、そしてキメラ子孫を生成することを目標とする。注射した胚盤胞を宿主偽妊娠雌に移入し、妊娠させる。

実験の経過を、出生時にマーカーを使用してモニターし得る。例えば、マウスにおいて、現在のところ、ほぼ全てのES細胞株が、129系統のマウス(アグーチ色毛を有する)から得られている。一般的に、宿主胚盤胞は、C57B1/6マウス(黒色毛を有する)から得られる。十分な割合でES細胞由来組織を有するキメラ動物は、通常、雄(ES細胞株は雄性)であり、主にアグーチ色毛を有する。

雄性子孫の優性は、雄性ES細胞株により雌性胚が性転換を起こした結果である(Robertson, E. J. ら、J. Embryol. Exp. Morph. 74:297-309 (1983))。しかし、生殖系列に遺伝する雌性キメラが作製されることもよくある(Lamb, B. T. ら、Nature Genetics 5:22-29 (1993))。キメラ動物の生殖系列において標的化遺伝子の有するか否かを試験するため、キメラ動物をC57B1/6のつがいの片方と戻し交配す



:224-227(1988))、ウサギ(Graves, K. H. ら、Molec. Reprod. Devel. 36:424-433(1993))、有尾猿(monkey)(Thomson, J. A. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:7844-7848(1995))、ブタ(Baetscher, M. W. ら、国際特許出願第W095/28412(1995))、鳥類(Shuman, R. M.、Experientia 47:897-905(1991))、魚類(Wakamatsu, Y. ら、Mol. Mar. Biol. Biotech. 3:185-191(1994))、モルモット、ウシ、イヌ、ウマ、ネコ、ヤギ、ヒツジ、爬虫類、両生類、ヒトおよびヒトニザルなどが挙げられる。

始原細胞生殖細胞(PGC)由来ES細胞は、増殖特性および使用に関して、前述のES細胞と類似している。ES細胞とは対照的に、PGC細胞は、胚盤胞の内部細胞塊からではなく、むしろ初期胚の生殖隆起の始原生殖細胞から樹立する(Matsui, Y. ら、Cell 70:841-847(1992))。PGC由来ES細胞株を樹立し、そして増殖させる細胞培養条件は、血清(例えば、FBS)および成長因子を必要とする。本発明の補充物および培地を用いて使用培地中の血清成分を置き換え、そしてPGC-由来ES細胞の樹立および増殖を行い得る。

一旦ES細胞株を樹立すると、将来の使用のために、凍結保存しなければならない。また、後に、再構成するために、ESクローンを保存することは、遺伝子ターゲティング過程では日常的である。凍結培地は、一般的に、5~10%DMSO、10

~90%FBS、および55~85%DMEM培地からなる。本発明の補充物を、凍結保存および再構成のための血清置換物として使用し得る。本発明の補充物を有するような細胞の凍結保存用条件として、0.5~95%補充物、1~10%凍結保護物質(例えば、ジメチルスルホキシド(DMSO))、および1~90%基本培地が挙げられる。ES細胞は、このような条件下、約-80℃以下で凍結し得る。ES細胞は、約-135℃以下の温度で無期限にずっと凍結し得る。

ES細胞を増殖または拡大させる場合、不活化支持細胞は、通常、ES細胞の培養前に、少なくとも数時間10%FBSを含有するDMEM培地(ES認定されている必要はない)に支持細胞をプレーティングすることにより調製する。この時間枠は、支持細胞層をそれ自体に付着させ、そして培養皿上に拡散させる。ES細胞およびES細胞培地を添加する前に、10%FBS含有培地を除去する。本発明の培地および補充物を、それぞれ培地含有血清および血清の置換物として使用して、胚盤胞支持

分の濃度よりも濃縮されている。例えば、成分を10倍濃縮(10×処方物)、25倍濃縮(25×処方物)、50倍濃縮(50×濃度)または100倍濃縮(100×処方物)し得る。特に、本発明の補充物または培地は、成分を適合性のある濃縮亜群に分けて作製し得る。米国特許第5,474,931号を参照のこと。

補充物または培地の成分を個別の濃縮溶液として調製する場合、各濃縮物の適(十分)量を希釈剤と混合して、薄めた濃縮処方物または1×製剤を作製する。代表的には、亜群に使用する希釈剤は、水であるが、緩衝水溶液、生理食塩水溶液、または他の水溶液を含む他の溶液も本発明に従って使用し得る。

代表的には、本発明の補充物または培地あるいは濃縮製剤(液体形態および乾燥形態の両方)を滅菌して、所望されない汚染を防止する。滅菌は、例えば、紫外線、加熱滅菌、放射線照射または濾過により達成し得る。

微量元素部分を含む化合物を調製して溶液にし得る。好ましくは、微量元素部分を含む化合物を濃縮溶液に分類してそして貯蔵する。例えば、1000~10,000×化学貯蔵溶液の作製が可能で、後の使用のために、液体として貯蔵し得るか、または適切なアリコートサイズで凍結し得る。

培養中のESおよび他の細胞の増殖を維持すると考えられる成分の濃度範囲を表1~3に列挙する。これらの成分は本発明の細胞培養培地補充物を形成させるために組み合わせられ得る。当業者に容易に明らかなように、所定の成分の濃度は、

開示された範囲を超えて増加または減少させ得、そして濃度の増加または減少の効果は、日常的な実験のみを使用することにより決定し得る。

本発明の補充物の成分濃度および本発明の培地濃度は、表1~3に列挙される濃度である。表1には、非微量元素部分含有成分の濃度を提供する。表1の2番目の欄には、無血清補充物中の成分濃度を提供する。表1の3番目の欄には、1×培地中に存在し得る成分の最終的な濃度範囲を提供する。表1の4番目の欄には、1×培地の好適な実施態様中の各成分についての最終濃度を提供する。

表2に微量元素部分の成分の濃度を提供する。表2の2番目の欄には、無血清補充物中の成分濃度を提供する。表2の3番目の欄には、1×培地中に存在し得る成分の最終的な濃度範囲を提供する。表2の4番目の欄には1×培地の好適な

ミノ酸溶液に直ぐに添加され得るか、または濾過されてから窒素ガス下で $-70^{\circ}\text{C}$ にて保存し得る。

トランスフェリンは貧鉄または鉄飽和であり得、そして異なる供給源（ウシ、ヒト等）に由来し得る。好適な実施態様では、鉄飽和ヒトトランスフェリンを使用する。

アルブミン-アミノ酸-トランスフェリン混合物のpHを5N NaOHでpH7.7~7.9に調整し、そしてインスリンおよび微量元素を添加する。所望の容量になるように細胞培養グレードの水を添加し、そしてこの水溶液を濾過滅菌する。それから、この補充物は、培養中のES細胞および他の細胞の増殖用に、血清の代わりに、そして血清と同じ濃度で使用され得る。

本発明の補充物は、好ましくは約 $4^{\circ}\text{C}$ で、最も好ましくは約 $-20^{\circ}\text{C}$ で保存されるが、この補充物は、もっと低い温度（例えば、約 $-80^{\circ}\text{C}$ ）で保存され得る。好ましくは、本発明の培地は、約 $4^{\circ}\text{C}$ で保存される。

種々の置換物（例えば、トランスフェリン置換物、インスリン置換物、アルブミン置換代替物など）は、本発明の補充物または培地を調製するために使用され得る。このような置換物を用いて本発明の補充物または培地を作製するための濃度および手順は、過度の実験を伴うことなく当業者により決定され得る。

本発明はまた、基本培地を本発明の無血清補充物と組み合わせることにより調製した真核生物細胞培養培地を提供する。この組み合わせは、基本培地を無血清補充物と混合または混和することにより達成され得る。好適な基本培地は、ダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）、最少必須培地（MEM）、イーグル基本培地（B

ME）、RPMI1640、F-10、F-12、 $\alpha$ 最少必須培地（ $\alpha$ MEM）、グラスゴー最少必須培地（G-MEM）、およびイスコフ（Iscove）改変ダルベッコ培地を含むが、これらに限定されない。

好ましくは、 $1 \times$ 培地の容量オスモル濃度は、約280~310mOsmolである。しかし、 $1 \times$ 培地の容量オスモル濃度は、約260mOsmol程度に低くてもよく、約350mOsmol程度に高くてもよい。好ましくは、基本培地には、約2.2g/Lの重炭酸ナトリウムが補充される。しかし、約3.7g/Lまでの重炭酸ナトリウムが使用され得る。

J. 編、奇形ガンおよび胚性幹細胞：A Practical Approach, IRL Press Oxford, UK(1987))により概説されている。

初代マウス胚線維芽細胞またはSTO細胞は、代表的に支持細胞として使用されるが、他の種類の線維芽細胞を使用しても良い。初代マウス胚線維芽細胞は、細かく刻まれた約13日齢の胚を培養し、そして数回の継代にわたって線維芽細胞集団を増殖させることにより作製される。対照的に、STO細胞は、胚系統の永続的な細胞株であり、初代細胞よりも長期に培養され得る。いずれの型の支持細胞も、使用前にマイトマイシンCまたはγ線照射での処理により不活化される。支持細胞は、このような処理後も代謝的に活性なままであるのに対し、この処理により支持細胞の有糸分裂は不活化される。ES細胞を継代するたびに、ES細胞は、支持細胞の新しい層の上に配置される。

本発明はまた、無血清培地中にES細胞を含む組成物を提供する。ここで、本発明の無血清補充物が添加される無血清培地は、無血清培地中のES細胞の増殖を支持し得る。この組成物のアリコートは、約-80℃以下で凍結し得る。この組成物のアリコートを、約-135℃以下で無期限に凍結し得る。この組成物のアリコートを融解しそして開けた後に、滅菌細胞培養技術を用いて、ES細胞を無血清培地中で培養し得る。ES細胞を入手し得る動物は、ヒト、有尾猿(monkey)、無尾猿(ape)、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、モルモット、ウシ、ブタ、イヌ、ウマ、ネコ、ヤギ、ヒツジ、鳥類、爬虫類、両生類、および魚類を含む。

表 2 微量元素部分の濃度			
成分	1×前処理 での濃度 実施標準 (mg/L) (約)	1×培養での 濃度範囲 (mg/L) (約)	1×培養での 濃度範囲 (mg/L) (約)
Ag <sup>+</sup>	0.0006	0.0000006-0.006	0.00009
Al <sup>3+</sup>	0.0007	0.00001-0.001	0.0001
Ba <sup>2+</sup>	0.008	0.00005-0.005	0.001
Cd <sup>2+</sup>	0.03	0.00003-0.03	0.005
Co <sup>2+</sup>	0.003	0.00003-0.003	0.0005
Cr <sup>3+</sup>	0.0003	0.00000008-0.0008	0.00004
Ge <sup>4+</sup>	0.003	0.000007-0.0007	0.0005
Sc <sup>4+</sup>	0.02	0.00005-0.005	0.007
Br	0.0004	0.0000007-0.0007	0.00006
I <sup>-</sup>	0.0007	0.000008-0.0008	0.0001
Mn <sup>2+</sup>	0.0004	0.000003-0.003	0.00006
F <sup>-</sup>	0.010	0.00005-0.005	0.002
Si <sup>4+</sup>	0.01	0.0001-0.1	0.02
V <sup>3+</sup>	0.003	0.000004-0.004	0.0004
Mo <sup>6+</sup>	0.005	0.0000008-0.0008	0.0007
Ni <sup>2+</sup>	0.0002	0.000002-0.0002	0.00003
Rb <sup>+</sup>	0.005	0.0000007-0.007	0.0008
Sn <sup>2+</sup>	0.0002	0.0000006-0.00006	0.00003
Zr <sup>4+</sup>	0.01	0.00005-0.005	0.0001

、第二の容器手段には、基本培地が含まれる。必要に応じて、第三の容器手段には、ES細胞が含まれる。本発明の補充物を含む製造製品は、好ましくは約4℃で、そして好ましくは約-20℃で保存される。本発明の培地を含む製造製品は、好ましくは約4℃で保存される。

本発明はまた、無血清培養でES細胞を拡大する方法を提供する。この方法では、ES細胞は、本発明の無血清培地を用いて無血清培養で培養される。この無血清培地には、本発明の無血清補充物が含まれる。

本発明はまた、無血清培養でのES細胞の分化を制御または防止する方法を提供する。本発明の補充物は無血清であるので、培養中のES細胞を未分化かつ多分化能状態に維持することを容易にする。所望の場合、細胞培養培地には、白血病阻害因子(LIF)(Life Technologies, Inc.)が補充され得る。ES細胞の分化を阻害する他の因子としては、S1因子(Matsui, Y.ら、Cell 70:841-847(1992)) ; および毛様体神経栄養因子(CNTF)(Conover, J.C.ら、Development 119:559-565(1993)) ) およびオンコスタチンM(Conover, J.C.ら、Development 119:559-565(1993)) が挙げられるが、これらに限定されない。

ES細胞の分化は、アルカリホスファターゼの組織化学的アッセイにより評価され得る(Pease, S.ら、Devel. Biol. 141:344-352(1990))。例えば、実施例1に示したように、Sigmaの診断キット86-R(Sigma Chemical, St. Louis, MO)が使用され得る。他のマーカーは、ES細胞の分化の程度を評価するために使用され得る。例えば、ECMA-7またはTROMA-1モノクローナル抗体が使用され得る(Brulet, P.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA:77:4113-4117(1980))。従って、当業者は、無血清補充物を用いた無血清培養でES細胞を培養することにより、ES細胞を拡大し、そして培養中に分化するのを防止し得る。

本発明の無血清補充物はまた、ES細胞を目的の細胞型に分化させるためにも使用され得る。当業者は、インビトロでES細胞を分化させるための技術に精通している。例えば、Dinsmore, J.ら、Cell Transplantation 5:131-143(1996) ; Ray, W.J.ら、J. Cell. Physiol. 168:264-275(1996) ; Palacios, R.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:7530-7534(1995) ; Setlow, J.K., Genetic Engineering:

小腸、大腸、精巣、前立腺、子宮、卵巣、リンパ腺、肝臓、脾臓、胸腺、および甲状腺のような組織に導入され得る。分化した細胞が外植され得る哺乳動物としては、ヒト、有尾猿、無尾猿、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、モルモット、ウシ、ブタ、イヌ、ウマ、ネコ、ヤギ、およびヒツジが挙げられる。

本発明の無血清補充物はまた、無血清培養で培養したES細胞（または他の細胞型）において組換えタンパク質を発現するために使用され得る。一般的に、培養した胚盤胞からES細胞を単離し、そして単離されたES細胞を、ES細胞の拡大の促進およびES細胞の分化の阻害に適した条件下で無血清培養で培養することにより、組換えタンパク質は得られる。より詳細には、組換えタンパク質は、目的のタンパク質をコードする核酸分子を含む核酸構築物（すなわち、DNA）をES細胞に（例えば、当業者に公知のエレクトロポレーション法またはトランスフェクション法により）導入することにより得られる。核酸構築物の導入後、組換えES細胞は選択され、そして本発明の無血清補充物を補充した基本培地を含む無血清培養で培養される。組換えタンパク質は、当業者に周知の方法により、ES細胞から単離され得る。例えば、Ausubel, F.M.ら編、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1994)を参照のこと。ES細胞を支持細胞と同時培養する場合、組換えタンパク質は、ES細胞および支持細胞の混合物から単離され得る。組換えタンパク質がES細胞から分泌される場合、組換えタンパク質は、ES細胞を培養した無血清培地から採集され得る。

本発明の無血清補充物はまた、トランスジェニック動物を作製するためにも使用され得る。これは、無血清培養でES細胞を培養する工程、ES細胞に核酸分子を導入する工程、組換えES細胞クローンを選択する工程、組換えES細胞クローンを拡大させて集団を形成させる工程、組換えES細胞クローン集団のアリコートを胚盤胞に注入する工程、注入された胚盤胞を宿主偽妊娠雌性動物に移す工程、およびトランスジェニック子孫を選択する工程により達成される。本発明はまた、この方法により得られたトランスジェニック動物も提供する。

トランスジェニック動物はまた、無血清培養でES細胞を培養する工程、ES細胞に核酸分子を導入する工程、組換えES細胞クローンを選択する工程、組換えES細胞

用して得られ得る動物には、ヒト、有尾猿、無尾猿、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、モルモット、ウシ、ブタ、イヌ、ウマ、ネコ、ヤギ、ヒツジ、鳥類、爬虫類、両生類、および魚類を包含する。

現在本発明を完全に記述している同様なものは、例示の目的のみで本明細書中に含まれる特定の実施例を参照することによってより明白に理解されるが、本発明を限定する意図はない。

以下の実施例において、他に特定しなければ、すべての培地、培地補充物、増殖因子および細胞培養試薬は、Life Technologies, Inc. (Gaithersburg, MD) から生産された。支持細胞培地は、以下のような最終成分濃度のDMEM(カタログ番号11965)から構成された：10%のFBS、2mMのL-グルタミン、50U/mLのペニシリンおよび50  $\mu$ g/mLのストレプトマイシン。

以下の実施例において、ES細胞血清補充培地は、15%のES適格FBS、2mMのL-グルタミン、100  $\mu$ MのNEAA、50U/mLのペニシリン、50  $\mu$ g/mLのストレプトマイシンおよび100  $\mu$ Mの2-メルカプトエタノール(Sigma)の最終濃度を有するDMEMから構成された。ES細胞培地にLIFを使用した場合、1000U/mL (10ng/mL) の最終濃度を得るために、ESGRO™ (マウス組換えLIF) を添加した。

#### 実施例 1

##### 基本処方物の確立

ES D3 ES細胞 (Doetschman, T. C. ら, J. Embryol. Exp. Morph. 87:27-45 (1985)) を使用した。他に特定しなければ、15継代のD3細胞を使用した。細胞層をリン酸緩衝化生理食塩水 (PBS) でリンスした後、プレートから細胞を除去するため、トリプシン-EDTA (0.25%、1mM) を使用した。加温37°C、10%CO<sub>2</sub>インキュベーター (恒温器) で細胞を培養した。

培地処方物評価アッセイのプロトコルは以下のとおりであった。実験のためのES細胞の供給源は、LIFとともにES細胞培地の支持細胞層上で維持された、ES細胞のサブコンフルエント皿であった。実験条件のための支持細胞層を、3~5×10<sup>4</sup>支持細胞/cm<sup>2</sup>を播種し、そして細胞を付着させることにより、6ウェルプレート (NUNC) 中で確立した。ES細胞をトリプシン処理し、細胞懸濁物を形成した。



トリブシン活性を血清補充培地でクエンチングし、そして細胞を、 $500 \times g$ の遠心分離によりペレット化した。培地を除去し、ES細胞を、2mMのL-グルタミン、50U/mLのペニシリン、 $50 \mu\text{g/mL}$ のストレプトマイシン、 $100 \mu\text{M}$ のNEAAおよび $100 \mu\text{M}$ の2-メルカプトエタノール（最終濃度）を含有するDMEMに再懸濁した。

次いで、ES細胞を、90細胞/mLの濃度で、各試験培地（以下に記述する）と混合した。次いで、支持細胞培地を支持細胞プレートから除去し、そして支持細胞層を、2mLのDMEM（血清あるいは他のいかなる添加剤を補充しなかった）で1回洗浄した。2.5mLの試験培地およびES細胞（225/ウェル）を、各ウェルの支持細胞に添加した。試験条件を3重（3ウェル/試験条件）にアッセイした。ES細胞増殖パラメータに関して観察を行う間、細胞を7日間インキュベートした。インキュベーション条件は、 $37^{\circ}\text{C}$ 、空気中10%  $\text{CO}_2$ および加湿雰囲気であった。

7日間の培養期間の終了時に観察を行ない、次いでES細胞を収集、固定し、組織化学的アッセイ（Sigma診断キット86-R, Sigma, St. Louis, MO）を使用して、アルカリホスファターゼの存在をアッセイした。製造業者の指示に従って、細胞を固定し、アッセイした。このアッセイでは、アルカリホスファターゼを発現する細胞は、暗紅色あるいは赤色に染色される。ES細胞コロニーを、以下のようなパラメータに従って、アルカリホスファターゼ染色の形態および強度の点から評価した。クラスIコロニーは円形で、暗紅色に染色され、輪郭のはっきりとしたコロニー辺縁を特徴とする、所望の未分化コロニー形態をもつ。クラスIIコロニーは分化し始めており、少なくとも60%紅色に染色され、はっきりとしない辺縁を有する、より平たくなった外観をもつ。クラスIIIコロニーは、明らかなコロニー分化の徴候を示し、ごくわずかな紅染色から紅染色ではない染色を有し、はっきりとした辺縁を有さない、平たくなった外観をもつ。ES細胞（225/ウェル）の入力数から得られたコロニーの全数を除することにより、プレーティング効率を決定した。

未分化ES細胞の増殖および維持を促進する能力について、上述のように、無血清培地補充物を評価アッセイで試験した。この補充物の基本処方物は、表1および3（各表の最右欄）に記述するとおりであったが、L-アスコルビン酸-2-ホ

を評価した。評価アッセイ（実施例 1 のように）では、培地に無血清補充物

（15%の最終濃度まで）を、L-アスコルビン酸-2-ホスフェート（50mg/Lの最終濃度）有りまたは無しのいずれかで補充し、および10mg/mL（最終濃度）のLIFを補充した。

3つのウェルの平均結果を表4に示す。表4では、括弧外の数字は、示された程度の分化を示したES細胞コロニー数である。括弧内の数字は、示された程度の分化を伴うコロニーを表す全ES細胞コロニーが何パーセントかを示す。表4では、「良好な」支持細胞形態は、紡錘状、凸凹様特性ではなく、むしろより線維芽細胞様の特性および滑らかな辺縁を反映する。

表4の結果は、L-アスコルビン酸-2-ホスフェートが、増殖培地のLIFの通常の有益な作用とは独立して、支持細胞層の外観を直接的に改善することを示唆する。増殖培地中のLIFとともに、L-アスコルビン酸-2-ホスフェートは事実上、得られた形態学的クラスのコロニーに影響を及ぼさなかった。しかし、L-アスコルビン酸-2-ホスフェートは、平均コロニーサイズ（増殖速度の指標）を幾分か増大させた。これはおそらく支持細胞層の改善によるものであった。

培地中LIFなしでは、この効果はより劇的であった。LIFの非存在下、そしてL-アスコルビン酸-2-ホスフェートの存在下において、クラスIコロニーのパーセントは増加し、クラスIIコロニーのパーセントは減少し、コロニーサイズは非常に改善された。この実験では、LIF単独はプレーティング効率に正の効果有したが、L-アスコルビン酸-2-ホスフェート単独はプレーティング効率にほとんど影響を及ぼさなかった。L-アスコルビン酸-2-ホスフェートは有意な負の効果を引き起こさず、そしてコロニーサイズおよび支持細胞層形態を明らかに改善したので、L-アスコルビン酸-2-ホスフェートを、本発明の処方物に添加した。

## 実施例 4

## 無血清培地を補充した培地での他のES細胞株の培養

本発明の補充物がD3株以外の他のES細胞株に有用であるかどうかを決定するために、3種類の追加のES株を、本発明の無血清補充物を補充した培地中で培養した。2匹のマウス系129ES株であるE14 (Hooper, M., Nature 326:292-295(1987))およびR1 (Nagy, A. ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:8424-8428(1993))を評価した。加えて、非129ES株であるTT2 (C57B1/6 X CBAF<sub>1</sub>) (Yagi, T. ら, Analyt. Biochem. 214:70-76(1993))を評価した。すべての3つのES細胞株について、無血清補充物を補充した培地中で増殖した細胞は、一般的に改善した細胞形態(すなわち、滑らかな細胞辺縁のある円形細胞)を示し、FBS補充培地中で増殖した細胞と比較して、あまり分化していなかった。従って、無血清条件下で、いずれかのES細胞株を培養するのに、本発明の無血清補充物を使用し得る。

## 実施例 5

## ES適格FBSおよび他の市販ウシ胎仔血清と無血清補充物との比較

実施例1のように、評価アッセイを実施した。ここで、8つの異なる試験条件下でD3 ES細胞を培養した。a)本発明の無血清補充物の2つの異なる製造ロット、b)ES適格FBSのロットおよびc~g)5つの異なるロットの市販血清(Hyclone, Logan, Utah)を補充した培地;を別々に補充した培地で細胞を培養した。すべての試験条件において、培地は10ng/mL(最終濃度)のLIFを含有した。結果(3ウェルの平均)を表5に示す。表5では、括弧外の数字は、示される程度の分化を表すES細胞コロニー数である。括弧内の数字は必要とする程度に分化したコロニーである総ES細胞コロニーのパーセントを示す。

本発明の無血清補充物の2つのロットは全く同じように機能した。すなわち、ES細胞は高いプレーティング効率を示し、ほとんど分化せず、すぐれた細胞およびコロニー形態を示した。2つのロットの同等の機能により、その明確で、再現

し得る組成物により、ES細胞培養に使用する、一定のロットの無血清補充物を予備試験する必要がないという事実が支持される。

無血清補充物はES適格FBS(表5)よりも明らかにすぐれている。無血清補充

表 5  
比較アッセイの結果

試験条件	I型コロニー (%)	クラスIIコロニー (%)	クラスIIIコロニー (%)	総コロニー (% プレーティング)	コロニーの特徴
本発明ロットA	227 (99%)	3 (1%)	0	230 (102%)	明瞭な辺縁のある円い暗紅色のコロニー
本発明ロットB	215 (99%)	3 (1%)	0	218 (97%)	明瞭な辺縁のある円い暗紅色のコロニー
ES適格のFBSコントロール	140 (73%)	47 (24%)	6 (3%)	193 (86%)	種々の程度のコロニー分化染色、均一な形状なし
Hyclone A	109 (67%)	37 (23%)	16 (10%)	162 (72%)	種々の程度のコロニー分化染色、均一な形状なし
Hyclone B	104 (69%)	37 (25%)	10 (6%)	151 (67%)	種々の程度のコロニー分化染色、均一な形状なし
Hyclone C	98 (70%)	34 (24%)	8 (6%)	140 (62%)	種々の程度のコロニー分化染色、均一な形状なし
Hyclone D	87 (66%)	35 (27%)	10 (7%)	132 (59%)	種々の程度のコロニー分化染色、均一な形状なし
Hyclone E	95 (72%)	27 (21%)	9 (7%)	131 (58%)	種々の程度のコロニー分化染色、均一な形状なし

これにより、ES細胞は培地において浮遊するボールへと凝集した。これらの細胞ボール（胚様体と呼ばれる）は、分化し始めた。胚様体は、懸濁培養液中で増殖し続けるか、または静電的に荷電したプラスチック（支持細胞なし）に付着するか、のいずれかであった。プラスチックに付着した胚様体から、細胞は、分化した集団（mass）から増殖した。in vitroで拍動する心臓細胞を含む多数の種々の

したES細胞は、2日間で、コンフルエントおよび過剰増殖であった。薬物を含まないES細胞の培養を、この時点で終結させた。

G418耐性細胞のコロニーを、FBS補充培地において培養した細胞から得られた耐性コロニー（すなわち、6日）と比較して、本発明の無血清補充物を補充した培地において培養した細胞からより迅速に（すなわち、4日後）得た。さらに、さらなる数のより耐性なコロニーを、本発明の無血清補充物を補充した培地において培養した細胞から得た。

無血清補充物は、試験したG418濃度の全ての範囲（ $150\mu\text{g/mL}$ ～ $450\mu\text{g/mL}$ ）にわたって、G418耐性コロニーのよりよい選択を促進した。例えば、 $250\mu\text{g/mL}$  G418で、全72の耐性コロニーを、FBS補充培地において得た（エレクトロポレーションした $3.4\times 10^6$ 細胞のうち）。対照的に、無血清培地を補充した培地において培養した細胞において、1104の耐性細胞を単離した（エレクトロポレーションした $3.4\times 10^6$ 細胞のうち）。さらに、これらの耐性コロニーは、FBS補充培地において選択した薬物耐性コロニーと比較して、改良された形態（すなわち、丸くなった細胞、平滑な輪郭、少ない分化）を示した。増加した選択効率が、無血清補充物を補充した培地において培養したES細胞の形質転換の実際の効率における増加に起因することは可能である。あるいは、無血清補充物によって付与された細胞生存度のレベルにおける増加が、耐性コロニーの数における全体の増加に寄与することは可能である。

#### 実施例 8

無血清補充培地において培養したES細胞の生殖系列コンピテンスの実証

継代16でのR1 ES細胞（Nagy, A. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:8424-8428(1993)）を、FBS補充培地（最終濃度17.5%）または本発明の無血清補充物を補充した培地のいずれかにおいて、12～14日間（4～5継代）培養した。この実験の経

過の間、無血清補充物を補充した培地で増殖させたES細胞コロニーは、血清補充培地において増殖したES細胞コロニーより、より丸くかつより清澄な様子（すなわち、平滑な細胞輪郭を示した）であることを観察した。

12または13日目（継代20）および14日目（継代21）で、無血清補充物を補充し

表 6  
出産児-9

	低血清培養地	血清補充培養地
注入した胚細胞の数	104	32
生存仔 (%)	20 (19%)	7 (22%)
キメラ仔 (%)	10 (50%)	3 (43%)
高血清キメラ (%)	7 (70%)	1 (33%)
高血清キメラ : (%)	3 (30%)	2 (67%)

## ハイブリドーマ細胞培養

本発明の無血清補充物を使用して、ハイブリドーマ細胞もまた増殖し得る。表8および9は、SP2/0（表8）およびAE-1（表9）ハイブリドーマ細胞の培養の結果を示す。表8および9の両方において、結果を、3～4日間隔の4継代培養にわたって、25cm<sup>2</sup>プラスチックフラスコ（細胞培養グレード）あたりの細胞の数（ $\times 10^6$ ）として示す。

付着因子は必要ではなかった。プラスチック増殖表面の処理も必要ではなかった。細胞を、標準的な細胞培養技術を用いてフラスコから除去した。培養物の表面を、冷Dulbeccoリン酸緩衝化生理食塩水（DPBS）で洗浄した。この洗浄の後に、1.0mLの冷トリプシン-EDTA（0.25%トリプシン、1mM EDTA）（Life Technologies, Inc.）で処理した。トリプシンEDTAを、3～5分間細胞表面に定着させ、次いで、細胞を、フラスコの表面から、手のひらに対して強く振り動かすことによって脱着させた。トリプシン活性を、DPBS中の1.5mLの大豆トリプシンインヒビター（0.1mg/mL）（Sigma, カタログ番号T9218）の添加によってクエンチした。細胞を、トリパンブルー排除法を用いて計数した。

新たな培養を、25cm<sup>2</sup>プラスチックフラスコあたり $2.5 \times 10^5$ でプレートした。プレートした細胞を、37°Cにて5%CO<sub>2</sub>雰囲気において培養した。表8および9の両方に示された結果を、2mM L-グルタミン（Life technologies, Inc.）を補充したRPMI 1640培地を用いる実験において得た。

表8および9における結果は、ハイブリドーマ細胞を、本発明の無血清補充物を補充した基本培地において培養し得ることを示す。

【図 1】

Figure 1A

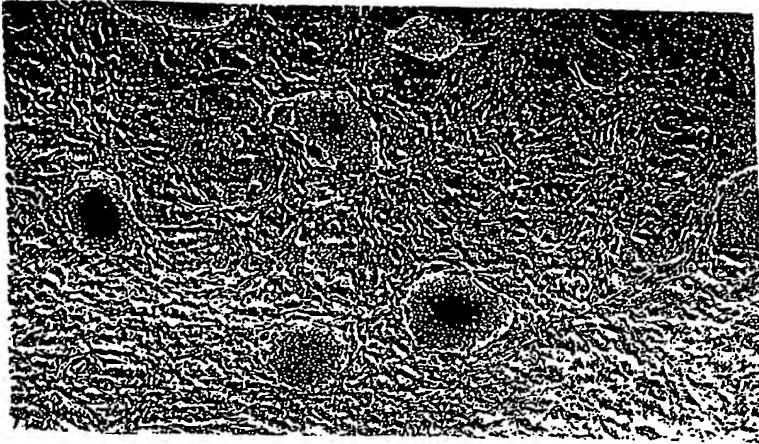
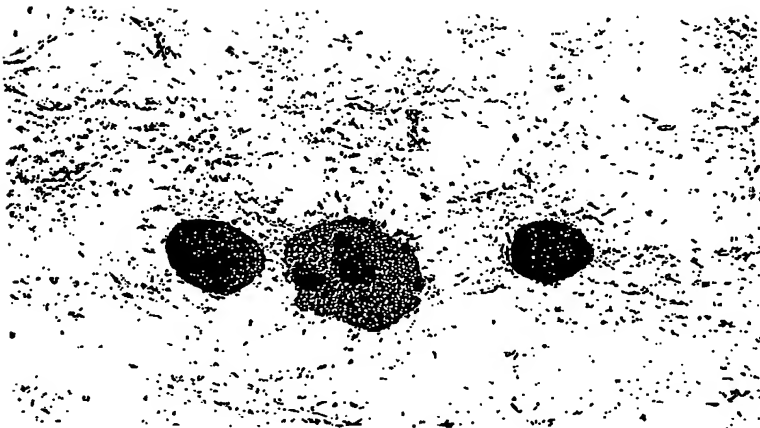


Figure 1B





## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US91/00467

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(6) : C12N 5/00, 5/02, 5/06, 5/08, 5/10, 15/00, 1/38 US CL : Please See Extra Sheet. According to International Patent Classification (IPC) or in both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/69.1, 70.1, 70.3, 172.1, 240.1, 240.2, 240.3, 240.31, 244, 948; 800/DIG 1, DIG 7; 935/53, 60, 66, 70 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Extra Sheet.		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MAURER, H.R. Towards Chemically-Defined, Serum-Free Media for Mammalian Cell Culture. In Animal Cell Culture, A Practical Approach, edited, R.I. Freshney. IRL Press Limited, Oxford, England. 1986. pages 13-31, see entire document.	1, 2, 4, 9, 10, 12, 20
Y		3, 5-8, 11, 13-19, 21-25, 29-33, 35-38
Y	HATA, R.-I. et al. L-Ascorbic Acid 2-Phosphate Stimulates Collagen Accumulation, Cell Proliferation, and Formation of a Three-Dimensional Tissue-like Substance by Skin Fibroblasts. J. Cell. Phys. 1989. Vol. 138. pages 8-16, especially page 8, under Introduction and Materials through page 9, under Cell culture, and page 10, under Results.	3, 21-25
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier document published on or after the international filing date "C" document which may throw doubts on priority claims or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reasons (as specified) "D" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "E" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"F" late document published after the international filing date or priority date and not to conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "G" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "H" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is considered with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "I" document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search 24 FEBRUARY 1993		Date of mailing of the international search report 25 MAR 1993
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer JANET M. KERR Telephone No. (703) 308-0196

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)\*

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US94/00467

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CONOVER, J. C. et al. Ciliary Neurotrophic Factor Maintains the Pluripotentiality of Embryonic Stem Cells. Development 1993, Vol. 119, pages 559-565, see entire document.	68-72, 74, 75
Y	ROSE T.M. et al. Oncostatin M (OSM) Inhibits The Differentiation of Pluripotent Embryonic Stem Cells In Vitro. Cytokine, January 1994, Vol. 6, No. 1., pages 48-54, see entire document.	68-72, 75
Y	KELLER, G.M. In Vitro Differentiation of Embryonic Stem Cells. Current Opinion in Cell Biology. 1995, Vol. 7, pages 862-869, see entire document.	76-79
Y	ZANG, M. et al. Production of Recombinant Proteins in Chinese Hamster Ovary Cells Using A Protein-Free Cell Culture Medium. Bio/Technology. April 1995, Vol. 13, pages 389-392, see entire document.	86-88
Y	MATSUI, Y. et al. Derivation of Pluripotent Embryonic Stem Cells from Murine Primordial Germ Cells in Culture. Cell. 04 September 1992, Vol. 70, pages 841-847, see entire document.	68-73

## フロントページの続き

(81) 指定国 EP (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), EA (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, GW, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, UZ, VN, YU, ZW

(72) 発明者 ゴールズボロー, マインディー ディー,  
アメリカ合衆国 メリーランド 20879,  
ゲイザーズバーグ, ジャイアントステップ  
プレイス 8304

(72) 発明者 ティルキンス, メアリー リン  
アメリカ合衆国 ニューヨーク 14304,  
ナイアガラ フォールズ, リンドバー ア  
ベニュー 6716

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record.**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER: \_\_\_\_\_**

## **IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**